



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/435, C12N 15/63, S/10, C12P 21/02, C07K 16/18, C12P 21/08, A61K 38/17 // (C12P 21/02, C12R 1:91)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/18205</p> <p>(43) 国際公開日 1999年4月15日(15.04.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04515</p> <p>(22) 国際出願日 1998年10月6日(06.10.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/274673 1997年10月7日(07.10.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 小野薬品工業株式会社 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒541-8526 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 本庶 佐(HONJO, Tasuku)[JP/JP] 〒606-0001 京都府京都市左京区岩倉大鷲町19-4 Kyoto, (JP) 加藤桂三(KATO, Keizo)[JP/JP] 〒647-0014 和歌山県新宮市浮島6-9 Wakayama, (JP) 多田秀明(TADA, Hideaki)[JP/JP] 〒618-8585 大阪府三島郡島本町桜井3丁目1番1号 小野薬品工業株式会社 水無瀬総合研究所内 Osaka, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 大家邦久、外(OHIE, Kunihisa et al.) 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: POLYPEPTIDE, cDNA ENCODING THE SAME, AND USE OF THEM</p> <p>(54)発明の名称 ポリペプチド、そのポリペプチドをコードするcDNA、およびそれらの用途</p> <p>(57) Abstract A polypeptide prepared from mouse ES cell strains by the SST method and a homologous polypeptide obtained from mouse kidney, human uterus, mouse fetus, human fetal liver and pancreas libraries; a cDNA encoding the polypeptide; a fragment selectively hybridizing with the sequence of the cDNA; a replication or expression plasmid containing the cDNA integrated thereinto; a host cell transformed with the plasmid; an antibody against the polypeptide; and a pharmaceutical composition containing the polypeptide or the antibody.</p>		

(57)要約

マウスE S細胞株からS S T法により得られるポリペプチド及びそれに相同するマウス腎、ヒト子宮、マウス胎児、ヒト胎児肝臓・膵臓ライブラリーから得られるポリペプチド、そのポリペプチドをコードするc DNA、そのc DNA配列に選択的にハイブリダイズするフラグメント、そのc DNAを組み込まれた複製又は発現プラスミド、そのプラスミドで形質転換された宿主細胞、そのポリペプチドの抗体、そのペプチドまたは抗体を含有する薬学的組成物。

PCTに基づいて公開される国際出願のパブリック第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボワール	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KR	韓国	SD	スーダン		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LC	セントルシア				

## 明 細 書

ポリペプチド、そのポリペプチドをコードするcDNA、およびそれらの用途

5

## 技術分野

本発明は、新規なポリペプチド、その製造方法、そのポリペプチドをコードするcDNA、そのcDNAからなるベクター、そのベクターで形質転換された宿主細胞、そのポリペプチドの抗体、およびそのペプチドまたは抗体を含有する薬学的組成物に関する。

10

更に詳細に述べると、ある種のマウス細胞ES細胞株が産生する新規なポリペプチドおよびそのホモログ、それらポリペプチドの製造方法、それらポリペプチドをコードするcDNA、それらcDNAからなるベクター、それらベクターで形質転換された宿主細胞、それらポリペプチドの抗体、およびそれらポリペプチドまたは抗体を含有する薬学的組成物に関する。

15

## 背景技術

個体発生の過程において、胚盤胞期の多能性分化能をもつ内部細胞塊は中胚葉誘導を経て血球や筋肉、骨などの様々な細胞系列へと分化をしていく。

この各細胞系列への分化の制御はその細胞自身が置かれている空間からの作用、すなわち細胞外からの分化誘導因子（あるいは抑制因子）または隣接する細胞表面分子からの刺激の強さやその組み合わせと変化により決定されることが考えられている。細胞系列特異的蛋白質としての転写因子やシグナル伝達系に関わる細胞内蛋白質も重要な役割を果たしていることは事実であるが、

それらの発現および細胞の挙動を大きく支配しているものは膜蛋白質（受容体）とそのリガンド分子であるといつてよい。これまでアクチビンをはじめとするTGF- $\beta$ スーパーファミリーやFGFファミリーに属する分子などが同定されているが、そのメカニズムとともにさらに未知の分子の関与が関

25

心の的となっており、現在もこの発生初期に働き、細胞の運命を決定づける分子の単離が試みられている。

近年の例を挙げると、この時期の胚に特異的に発現する遺伝子をディフュ  
レンシャルディスプレイ、あるいは内胚葉、中胚葉、外胚葉と胚を分離し胚  
5 葉特異的に発現する遺伝子をサブトラクションといった手法で単離する試み  
が報告されている(M. J. Guimaraes et al., Development, 121, 3335-3346,  
1995、S. M. Harrison et al., Development, 121, 2479-2489, 1995参照)。し  
かしこれらの方法は、発生初期の小さな胚を大量に分離しなければならず、  
また実際に遺伝子が単離されても細胞内蛋白質であったり、いまだに液性因  
10 子やその受容体らしき分子の単離はなされていない。

本発明者らは、これまで造血系や免疫系で働く増殖分化因子の遺伝子のク  
ローニングを研究してきた。そして、増殖分化因子（例えば、各種サイトカ  
イン等）のような分泌蛋白質やその受容体のような膜蛋白質の大部分がその  
N末端にシグナルシーケンスと呼ばれる配列を有していることに着目して、  
15 シグナルシーケンスをコードする遺伝子を効率的かつ選択的にクローニン  
グする方法を鋭意検討した。その結果、N末端断片を効率的に増幅させ、シ  
グナルシーケンスを簡便に検索できる方法（シグナルシーケンスストラッ  
プ：S S T）を開発した（特開平6-315380号、Tashiro et al., Science,  
261, 600-603, 1993参照）。

20

#### 発明の開示

本発明者らは、E S細胞の分化誘導時に産生され、初期発生および初期造  
血に関与する新規の分泌蛋白質を見い出すべく、S S T法を用いて鋭意検討  
を行なった。

25 その結果、本発明者らは、胚盤胞期の多能性分化能をもつ内部細胞塊由来  
の細胞であるE S細胞から血球細胞へ分化誘導を行なう培養系(T. Nakano,  
et al., Science, 265, 1098-1101, 1994参照)に着目し、分泌蛋白質や膜蛋  
白質を効率的にクローニングすることができるS S Tと組み合わせて、

ＯＨＰ１０６と名付けられた新規因子（ポリペプチド）およびそれらをコードするｃＤＮＡ、さらには新規のＯＨＰ１０６関連因子群およびそれらをコードするｃＤＮＡを見い出すことに成功し、本発明を完成した。

核酸配列データベースに登録されている既知の核酸配列に対してBLASTNおよびFASTAにより、またアミノ酸配列データベースに登録されている既知のポリペプチドのアミノ酸配列に対してBLASTX、BLASTPおよびFASTAにより検索した結果、本発明のポリペプチドマウスＯＨＰ１０６およびそれをコードする核酸配列と一致する配列はなかった。また、疎水性プロットによる解析から、本発明のポリペプチドは膜貫通領域を持たないことが予想された。このことから、本発明のポリペプチドは、新規な分泌蛋白質であることが判明した。

すなわち本発明は、

- (１) 配列番号１、４、７、１０または１３で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- (２) 前記(１)に記載したポリペプチドをコードするｃＤＮＡ、
- (３) 配列番号２、５、８、１１または１４で示される塩基配列を有するｃＤＮＡ、
- (４) 配列番号３、６、９、１２または１５中に示される塩基配列を有するｃＤＮＡ、に関する。

#### 図面の簡単な説明

第１図は、電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）後のアクリルアミドゲルについてイメージング・アナライザー（FUJI BAS2000）を用いて検出したプリンター打ち出し図であり、マウスＯＨＰ１０６の蛋白発現を示す。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、実質的に純粋な形である配列番号１、４、７、１０または１３で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、そのホモログ、その配列

のフラグメントおよびそのホモログに関する。

本発明は、さらにそれらのポリペプチドをコードするcDNAに関する。  
より具体的には、配列番号2、5、8、11または14で示される塩基配列、  
あるいは3、6、9、12または15中に示される塩基配列を有するcDN  
5 A、および配列番号2、5、8、11または14で示される塩基配列、ある  
いは3、6、9、12または15中に示される塩基配列に選択的にハイブリ  
ダイズするフラグメントを有するcDNAに関する。

ハイブリダイズするcDNAには、上記配列の相補配列も含まれる。

実質的に純粋な形である配列番号1、4、7、10または13で示される  
10 アミノ酸配列を有するポリペプチドとは、一般に、生産時のポリペプチドの  
90%以上、例えば、95、98または99%が配列番号1、4、7、10  
または13で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドであることを意味  
する。

配列番号1、4、7、10または13で示されるアミノ酸配列からなるポ  
15 リペプチドのホモログとは、一般に少なくとも20個、好ましくは少なく  
とも30個、例えば40、60または100個の連続したアミノ酸領域で、  
少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、より好ましく  
は95%以上相同性であるものであり、そのようなホモログは、以下本発  
明のポリペプチドとして記載される。

20 さらに、配列番号1、4、7、10または13で示されるアミノ酸配列か  
らなるポリペプチドのフラグメント、またはそれらのホモログのフラグメ  
ントとは、少なくとも10アミノ酸、好ましくは少なくとも15アミノ酸、  
例えば20、25、30、40、50または60アミノ酸部分を意味する。

配列番号2、5、8、11または14で示される塩基配列あるいは3、6、  
25 9、12または15中に示される塩基配列を有するcDNAに選択的にハイ  
ブリダイズするcDNAとは、一般に、少なくとも20個、好ましくは少な  
くとも30個、例えば40、60または100個の連続した塩基配列領域で、  
少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、より好ましく

は95%以上相同性であるものであり、そのようなcDNAは、以下本発明のcDNAとして記載される。

配列番号2、5、8、11または14で示される塩基配列あるいは3、6、9、12または15中に示される塩基配列を有するcDNAのフラグメント  
5 とは、少なくとも10塩基、好ましくは少なくとも15塩基、例えば20、25、30または40塩基部分を意味し、そのようなフラグメントも本発明のcDNAに含まれる。

さらに、本発明には、本発明のcDNAからなる複製または発現ベクターが含まれる。ベクターとしては、例えば、ori領域と、必要により上記  
10 cDNAの発現のためのプロモーター、プロモーターの制御因子などからなるプラスミド、ウィルスまたはファージベクターが挙げられる。ベクターはひとつまたはそれ以上の選択的マーカー遺伝子、例えばアンピシリン耐性遺伝子を含んでいてもよい。ベクターは、イン・ビトロ (in vitro) において、例えばcDNAに対応するmRNAの製造、宿主細胞の形質転換に用いるこ  
15 とができる。

さらに、本発明には、配列番号2、5、8、11または14で示される塩基配列あるいは3、6、9、12または15中に示される塩基配列、またはそれらのオープンリーディングフレームを有するcDNAを含む本発明のcDNAを複製または発現させるためのベクターで形質転換された宿主細胞  
20 も含まれる。細胞としては、例えば細菌、酵母、昆虫細胞または哺乳動物細胞が挙げられる。

さらに、本発明には、本発明のポリペプチドを発現させるための条件下で、本発明の宿主細胞を培養することからなる本発明のポリペプチドの製造方法も含まれる。培養は、本発明のポリペプチドが発現し、宿主細胞より製造さ  
25 れる条件下で行なわれることが好ましい。

本発明のcDNAは、上記のようなベクターのアンチセンス領域に挿入することでアンチセンスmRNAを製造することもできる。このようなアンチセンスmRNAは、細胞中の本発明のポリペプチドのレベルを制御すること

に用いることもできる。

本発明は、本発明におけるポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体をも含む。さらに本発明におけるポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体の製造方法をも含む。モノクローナル抗体は、本  
5 発明のポリペプチド、またはその断片を抗原として用い、通常のハイブリドーマの技術により製造することができる。ポリクローナル抗体は、宿主動物（例えば、ラットやウサギ等）に本発明のポリペプチドを接種し、免疫血清を回収する、通常の方法により製造することができる。

本発明には、本発明のポリペプチド、その抗体と薬学的に許容される賦形剤および／または担体を含有する薬学的組成物も含まれる。  
10

（１）の本発明のポリペプチドとしては、配列番号１、４、７、１０または１３で示されるアミノ酸配列を有するもの以外に、その一部が欠損したもの（例えば、配列番号１、４、７、１０または１３中、生物活性の発現に必須な部分だけからなるポリペプチド等）、その一部が他のアミノ酸と置換したもの（例えば、物性の類似したアミノ酸に置換したもの）、およびその一部に他のアミノ酸が付加または挿入されたものも含まれる。  
15

よく知られているように、ひとつのアミノ酸をコードするコドンは１～６種類（例えば、Metは１種類、Leuは６種類）存在する。従って、ポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなくcDNAの塩基配列を変えることができる。  
20

（２）で特定される本発明のcDNAには、（１）の配列番号１、４、７、１０または１３で示されるポリペプチドをコードするすべての塩基配列群が含まれる。塩基配列を変えることによって、ポリペプチドの生産性が向上することがある。

（３）で特定されるcDNAは、（２）で示されるcDNAの一態様であり、天然型配列を表わす。  
25

（４）に示されるcDNAは、（３）で特定されるcDNAに天然の非翻訳部分を加えた配列を示す。



配列番号 3、6、9、12 または 15 中に示される塩基配列を有する cDNA の作製は、以下の方法に従って行なわれる。

シグナルシーケンストラップ (SST) 用 cDNA ライブラリーの作製:

- (1) 対象となる細胞より mRNA を単離し、特定の制限酵素 (酵素 I)
- 5    サイトを連結したランダムプライマーを用いて二本鎖 cDNA を合成し、
- (2) サイズで分画した後、酵素 I とは異なる特定の制限酵素 (酵素 II)
- サイトを含むアダプターを連結し、
- (3) 酵素 I サイトを含むプライマーと酵素 II サイトを含むプライマーを用
- いてポリメラーゼ連鎖反応 (以下、PCR と略記する。) に付し、増幅され
- 10    た cDNA を酵素 I - 酵素 II で消化した後、再度分画し、
- (4) 得られた cDNA 断片を、シグナルシーケンスを削除した公知の膜
- 蛋白質等の遺伝子上流に連結し、真核細胞発現プラスミドベクターに組み
- 込んだ後、形質転換する工程よりなる。

- 各工程を詳しく説明すると、工程 (1) では、対象となる細胞より、
- 15    Chomczynski, P 等の方法 (Anal. Biochem. 162, 156 (1987) に記載) に準じて全
  - mRNA の単離が行なわれる。また mRNA の精製は Oligo (dT) カラム等を用
  - いて行なわれる。

- 対象となる細胞としては、o p / o p マウス新生仔頭蓋冠由来ストローマ
- 細胞株 OP9 細胞 (H. Kodama, et. al., Exp. Hematol., 22, 979-984, 1994) と
  - 20    共生培養して血液細胞へ分化誘導したマウス ES (Embryonic Stem) 細胞株
  - D3 (T. C. Doetschman, et. al., J. Embryol. Exp. Morphol., 87, 27, 1985) が
  - 挙げられる。

- 次に (酵素 I) サイトを連結したランダムプライマーを用いて一本鎖
- cDNA を合成した後、Gubler & Hoffman の方法により二本鎖 cDNA を合
  - 25    成する。

工程 (2) は、T4 cDNA ポリメラーゼで末端を平滑化し、酵素 II アダ

プターを連結し、アガロース電気泳動により 400 ~ 600 bp の cDNA

に分画することにより行なわれる。ランダムプライマーに連結される制限酵

素（酵素I）サイトと工程（2）で用いられる制限酵素（酵素II）サイトは、互いに異なるものであれば何を用いてもよい。好ましくは、酵素IとしてS a l I、酵素IIとしてはE c o R Iが用いられる。

工程（3）では、P C Rによりc D N Aの増幅を行なう。増幅された  
5 c D N Aは酵素I－酵素IIで消化し、アガロース電気泳動により3 0 0～8 0 0 b pのc D N Aに分画される。

工程（4）は、真核細胞発現用プラスミドベクターにシグナルシーケンスを削除した公知の膜蛋白質等の遺伝子（レポーター遺伝子という。）と、その上流に工程（3）で得られたc D N A断片とを組み込んで形質転換する  
10 工程である。真核細胞発現用プラスミドベクターとしては種々のものが知られているか、例えば、p c D L－S R  $\alpha$ やp c E V－4が用いられる。

また、レポーター遺伝子としては、あらゆる種類の可溶性分泌蛋白質および膜蛋白質の成熟蛋白部分の遺伝子が用いられる。さらに、これらのレポーター遺伝子は、抗体法などの何らかの方法でその発現が確認できるものでな  
15 ければならない。ここではヒトI L－2レセプター $\alpha$ 遺伝子が用いられる。形質転換のための宿主大腸菌株はすでに多くのものが知られており、いずれを用いてもよいが、好ましくはD H 5のコンピテントセルである。形質転換体は常法により培養され、本発明のc D N Aライブラリーが得られる。

本発明のc D N Aライブラリー作製方法では、ライブラリー中に蛋白質の  
20 N末端をコードする遺伝子断片を含む可能性は高いが、すべてのクローンがシグナルペプチドを含んでいる訳ではないし、またすべてが未知の（新規な）シグナルシーケンスをコードする遺伝子断片とは限らない。そこで、次に該ライブラリーから未知のシグナルシーケンスをコードする遺伝子断片をスクリーニングする必要がある。

25 すなわち、c D N Aライブラリーを適当なサイズのプールに細分化し、発現系に組み込む。ポリペプチドを生産するための発現系としては、哺乳動物細胞（例えば、サルC O S－7細胞、チャイニーズハムスターC H O細胞、マウスL細胞等）が挙げられる。トランスフェクションは、例えばD E A E

ーデキストラン法によって行なわれる。培養後、レポーター遺伝子の発現の有無を判定する。

レポーター遺伝子は、シグナルシーケンスが他の分泌蛋白質に固有のものであっても発現することか知られている。すなわち、レポーター遺伝子が  
5 発現されたということは、ライブラリー中に何らかの分泌蛋白質のシグナルシーケンスが組み込まれていたことを示している。陽性を示すプールについてはさらに細分化を行ない、単クローンを得るまで発現と判定を繰り返す。レポーター遺伝子の発現の判定は、レポーター遺伝子の種類によって異なるが、蛍光標識抗体法、酵素標識抗体法（ELISA法）、放射性標識抗体法（RIA法）などにより行なわれる。ここではフルオレセイン・イソチ  
10 オシアネートでラベルした抗ヒトTacによる蛍光標識抗体法が用いられる。

次に、単離した陽性クローンについて、塩基配列を決定し、データベースとの相同性検索を行なう。未知の蛋白質をコードすることが明らかになった  
cDNAについては、それをプローブとして、全長cDNAライブラリーあ  
15 るいはゲノムライブラリーとハイブリダイズさせることにより、あるいは適当な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、それを用いて、哺乳類由来のcDNAライブラリー、あるいはmRNAからPCR法により、全長クローンを単離し、全長の塩基配列を決定することができる。

陽性クローンの塩基配列が、一部、好ましくは全てが確定されると哺乳類  
20 に存在する本発明の蛋白質をコードするcDNAもしくは本発明蛋白質のホモログおよびサブセットをコードするcDNAを得ることができる。適当な該マウス塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、それを用いて、哺乳類由来のcDNAライブラリーあるいはmRNAからPCR法により、あるいは適当な該マウス塩基配列の断片をプローブとしてハイブリダイズさ  
25 せることにより、哺乳類cDNAライブラリーあるいは該ゲノムライブラリーから、哺乳類型の当該蛋白質をコードするcDNAを得ることができる。

例えば、配列番号2で示される塩基配列あるいは配列番号3中に示される塩基配列で示されるマウスOHP106の塩基配列が確定された後、マウス

腎臓 cDNA ライブラリーよりマウス OHP 106 の塩基配列のオープンリーディングフレーム内に 22 bp の挿入配列を有するクローン、マウス OHP 106 K を、またヒト子宮 cDNA ライブラリーよりマウス OHP 106 の塩基配列と高い相同性を有し、マウス OHP 106 のヒトカウンターパートと考えられる約 550 bp のクローン、ヒト OHP 106 を見出した。さらにマウス 13.5、14.5 日胎児 cDNA ライブラリーおよびヒト胎児肝臓、脾臓 cDNA ライブラリーよりマウス OHP 106 と有意な相同性を示すクローン、マウス OHP 106 H およびヒト OHP 106 H を見出した。

このようにして得られた cDNA が、SSF で得られた cDNA 断片の塩基配列（またはその相同配列）を含んでいるならばシグナルシーケンスをコードしていることになるので、その cDNA が全長、またはほぼ全長であることは明らかである（シグナルシーケンスは例外なく蛋白質の N 末端に存在することから、cDNA のオープンリーディングフレームの 5' 末端にコードされている。）。

さらに、該 cDNA をプローブとしてノザン (Northern) 解析によって全長の確認をしてもよい。ハイブリダイズしたバンドから得られる mRNA のサイズと該 cDNA のサイズを比較し、ほぼ同じであれば該 cDNA はほぼ全長であると考えられる。

配列番号 2、5、8、11 または 14 で示される塩基配列あるいは 3、6、9、12 または 15 中に示される塩基配列が一旦確定されると、その後は、化学合成によって、あるいは該塩基配列の断片を化学合成し、これをプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の cDNA を得ることができる。さらに、本 cDNA を含有するベクター cDNA を適当な宿主に導入し、これを増殖させることによって、目的とする cDNA を必要量得ることができる。

本発明のポリペプチドを取得する方法としては、

- (1) 生体または培養細胞から精製単離する方法、
- (2) ペプチド合成する方法、または

(3) 遺伝子組み換え技術を用いて生産する方法、

などが挙げられるが、工業的には(3)に記載した方法が好ましい。

遺伝子組み換え技術を用いてポリペプチドを生産するための発現系(宿主-ベクター系)としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の発現系が挙げられる。

例えば、大腸菌で発現させる場合には、成熟蛋白部分をコードするcDNAの5'末端に開始コドン(ATG)を付加し、得られたcDNAを、適当なプロモーター(例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、λPLプロモーター、T7プロモーター等)の下流に接続し、大腸菌内で機能するベクター(例えば、pBR322、pUC18、pUC19等)に挿入して発現ベクターを作製する。

次に、この発現ベクターで形質転換した大腸菌(例えば、E. Coli DH1、E. Coli JM109、E. Coli HB101株等)を適当な培地で培養して、その菌体より目的とするポリペプチドを得ることができる。また、バクテリアのシグナルシーケンス(例えば、pelBのシグナルシーケンス)を利用すれば、ペリプラスム中に目的とするポリペプチドを分泌することもできる。さらに、他のポリペプチドとのフュージョン・プロテイン(fusion protein)を生産することもできる。

また、哺乳動物細胞で発現させる場合には、例えば、配列番号3、6、9または12中に示される塩基配列を適当なベクター(例えば、レトロウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等)中の適当なプロモーター(例えば、SV40プロモーター、LTRプロモーター、メタロチオネインプロモーター等)の下流に挿入して発現ベクターを作製する。次に、得られた発現ベクターで適当な哺乳動物細胞(例えば、サルCOS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、マウスL細胞等)を形質転換し、形質転換体を適当な培地で培養することによって、その培養液中に目的とするポリペプチドが分泌される。以上のようにして得られたポリペプチドは、一般的な生化学的方法によって

単離精製することができる。

#### 産業上の利用可能性

本発明のポリペプチドおよびそれをコードするcDNAは、一つあるいはそれ以上の効果あるいは生物活性（以下に列挙するアッセイに関連するものを含む）を示すことが考えられる。本発明の蛋白に関して記述される効果あるいは生物活性は、その蛋白の投与あるいは使用により、あるいは、その蛋白をコードするcDNAの投与あるいは使用（例えば、遺伝子療法やcDNA導入に適したベクター）により、提供される。

#### 10 [サイトカイン活性および細胞増殖／分化活性]

本発明の蛋白は、サイトカイン活性および細胞増殖（誘導あるいは阻害）／分化活性（誘導あるいは阻害）を示す可能性、あるいはある細胞集団に他のサイトカインの産生を誘導あるいは抑制すると考えられる。全ての既知のサイトカインを含む、現在発見されている多くの蛋白性因子は、因子に依存した一つあるいはそれ以上の細胞増殖アッセイ法で、活性を示してきたので、それらのアッセイは、サイトカイン活性の便利な確認法として機能する。本発明の蛋白の活性は、多くの従来の因子依存性の細胞株の細胞増殖アッセイのうちのいずれかによって証明され得る。

#### [免疫刺激／抑制活性]

20 本発明の蛋白は、免疫刺激活性および免疫抑制活性を示すと考えられる。また、ある蛋白は、例えば、Tリンパ球およびBリンパ球あるいはどちらか一方の成長および増殖を制御（刺激あるいは抑制）することや、同様にNK細胞や他の集団の細胞傷害性活性に影響を与えることによって、様々な免疫不全および疾患（severe combined immunodeficiency（SCID）を含む）  
25 の治療に効果を示すと考えられる。これらの免疫不全は遺伝性である場合もあるし、例えばHIVのようなウィルスや、同様に細菌やカビの感染が原因で起こる場合もある。あるいは、自己免疫疾患から由来する可能性もある。より特殊な場合に、HIV、肝炎ウィルス（hepatitis viruses）、ヘルペス

ウィルス (herpes viruses)、マイコバクテリア (mycobacteria)、リーシュマニア (leishmania)、マラリア (malaria) およびカンジダ (candida) のような様々なカビ感染を含む、ウィルス、細菌、カビあるいは他の感染による感染症の原因を、本発明の蛋白を用いることによって治療できると考えられる。もちろん、この関連より、本発明の蛋白は、免疫システムが増大していることが一般的に示唆される場所、すなわち癌治療の箇所において効果を示すと考えられる。

本発明の蛋白は、アレルギー反応および喘息や他の呼吸器系疾患のような状況の治療に効果を示すと考えられる。免疫抑制が望まれるような他の状態 (例えば、喘息や関連呼吸器疾患を含む) にも、本発明の蛋白を用いて治療できると考えられる。

本発明の蛋白は、例えば、敗血病性のショックあるいは全身性炎症反応症候群 (SIRS) のような感染、炎症性大腸炎、クローン病に関連する、あるいは IL-11 により効果が証明された TNF や IL-1 のようなサイトカインの過剰産生から由来する慢性あるいは急性の炎症を抑制する可能性もある。

#### [造血細胞制御活性]

本発明の蛋白は、造血細胞の制御に、またそれに応じて骨髓球様細胞あるいはリンパ球様細胞の欠乏に対する治療にも効果を示すと考えられる。コロニー形成細胞あるいは因子依存性細胞株の援助の下での極く弱い生物活性でさえも、造血細胞の制御に係わることを示唆する。その生物活性とは、次に挙げる全てあるいはそのいずれかで例えられるようなものに係わるものである。赤血球前駆細胞のみの成長および増殖を支持、あるいは他のサイトカインとの組み合わせ、また、それが示唆する有効性、例えば様々な貧血の治療、あるいは赤血球前駆細胞および赤血球あるいはそのどちらかの産生を刺激する放射線療法/化学療法と組み合わせた使用; 顆粒球および単球/マクロファージのような骨髓球の成長および増殖を支持 (すなわち、古典的な CSF 活性)、化学療法に伴う骨髓抑制を防ぐための化学療法との併用; 巨核球

の成長および増殖およびそれに続く血小板の成長および増殖の支持、それによって血小板減少症のような様々な血小板障害を防御および治療を可能とする血小板輸血の際あるいは相補的な一般的使用：上記造血細胞の幾つかあるいは全ての細胞へ成熟可能な造血幹細胞の成長および増殖の支持、従って、

5 様々な幹細胞障害（限定はされないが、再生不良性貧血および発作性夜間血色素尿症を含む、移植で一般的に治療されるようなもの）に治療的効果を見い出せる、また、正常細胞あるいは遺伝子療法のため遺伝的に操作された細胞をイン・ビトロ（in vitro）あるいはエクス・ビボ（ex vivo）（すなわち、骨髄移植に伴う）どちらかで、放射線療法／化学療法後の幹細胞分画の再構築を行なうことも同様である。

10

本発明の蛋白は、他の方法の中で、以下の方法により測定することが可能である。

〔組織生成／修復活性〕

本発明の蛋白は、損傷治癒および組織修復、また、火傷、切開、および潰瘍の治療と同様に、骨、軟骨、腱、靱帯、および神経組織成長あるいは再生

15 のいずれかに使用されると考えられる。

骨を正常に形成しない環境での軟骨および骨あるいはいずれかの成長を誘導するような本発明の蛋白は、ヒトおよび他の動物の骨折および軟骨損傷あるいは欠損の治癒に適用される。本発明の蛋白を使用している製剤は、開放骨折と同様に閉鎖骨折の整復、また人工関節の固定の改良にも、予防的に使用

20 できるものと考えられる。骨形成剤により誘導された新生骨形成は、先天性、外傷性、癌切除術により誘発した頭蓋顔面の欠損の修復に貢献する。また、美容形成外科分野にも有効である。

本発明の蛋白は、歯根膜症の治療および他の歯の修復にも使用されると考えられる。そのような薬品は、骨形成細胞を引き寄せ、その細胞の増殖を刺激し、その前駆細胞の分化を誘導する環境を提供すると考えられる。該発明の蛋白は、骨および軟骨あるいはいずれかの修復を刺激することを通して、

25 あるいは、炎症あるいは炎症過程で介される組織破壊（コラゲナーゼ活性や



破骨細胞の活性)の過程を阻止することにより、骨粗鬆症および骨関節炎の治療に有効と考えられる。

本発明の蛋白に起因すると考えられる組織再生活性の別のカテゴリーは腱／靭帯形成である。本発明の蛋白は、腱／靭帯様組織あるいは他の組織が正  
5 常形成されない環境でそのような組織形成を誘導するものであるが、ヒト  
および他の動物における腱／靭帯の裂傷、奇形、および他の腱／靭帯の障害  
の治療に適用できる。腱／靭帯様組織を誘導する蛋白を使用している製剤は、  
骨あるいは他の組織への腱／靭帯の固定の改良、および腱／靭帯組織の欠損  
の修復での使用はもちろん、腱あるいは靭帯の損傷の防御に対する予防的使  
10 用も考えられる。本発明の構成物により誘導される新生腱／靭帯様組織形成  
は、先天性、外傷、あるいは他の起源の腱あるいは靭帯欠損の修復に貢献す  
る。また、腱あるいは靭帯の貼付あるいは修復という美容形成外科でも有効  
である。本発明の構成物は、腱／靭帯形成細胞を引き寄せ、その細胞の増殖  
を刺激し、その前駆細胞の分化を誘導する環境を提供すると考えられる。あ  
15 るいは、組織修復を果たすためイン・ビボ (in vivo) への返還に備えてエク  
ス・ビボ (ex vivo) で腱／靭帯細胞あるいはその前駆細胞を誘導する。本発  
明の構成物は、腱炎、手根トンネル症候群 (Carpal tunnel syndrome)、お  
よび他の腱あるいは靭帯欠損の治療にも有効である。該構成物には、適当な  
マトリックスおよびキャリアーと同様に当業者に良く知られているシークエ  
20 スタリング (Sequestering) 剤も含まれる。

本発明の蛋白は、神経細胞の増殖、および、神経および脳組織の再生、す  
なわち、神経細胞あるいは神経組織の変性、死、あるいは外傷を含む機械的  
および外傷的障害と同様に中枢および末梢神経系疾患および神経病の治療に  
対しても効果を示すと考えられる。より特異的には、ある蛋白は、末梢神経  
25 障害、末梢神経症、および局所的神経症のような末梢神経系の疾患、および  
アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索症  
(amyotrophic lateral)、およびシャイ・ドレーガー (Shy-Drager) 症候群  
のような中枢神経系の疾患の治療に有効であると考えられる。さらに本発明

に応じて治療され得る条件には、脊髄障害、頭部外傷、および脳卒中等の脳血管疾患のような機械的および外傷的障害を含む。化学療法あるいは他の治療から起因する末梢神経症も本発明の蛋白を用いて治療可能である。

- 本発明の蛋白は、例えば脾臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚、内皮を含む臓器、
- 5 平滑、骨格あるいは心臓筋肉、および血管内皮を含む血管組織のような他の組織を生成する活性、あるいはそのような組織を構成する細胞の増殖を促進する活性を示す可能性も期待される。望まれる効果の一部は、正常組織を再生させる繊維性瘢痕（scarring）の阻害によっても担われると考えられる。

- 本発明の蛋白は、消化管保護あるいは再生、および肺あるいは肝臓の繊維
- 10 化、様々な組織の再還流損傷、および全身性サイトカイン障害に起因する状態に対する治療にも有効であると考えられる。

[アクチビン／インヒビン活性]

- 本発明の蛋白は、アクチビン／インヒビンに関連した活性を示すと考えられる。アクチビンは濾胞刺激ホルモン（FSH）の放出を刺激する活性によって特徴づけられるが、インヒビンは、濾胞刺激ホルモン（FSH）の放出
- 15 を阻害する活性によって特徴づけられる。よって、本発明の蛋白は、単独あるいはインヒビンaファミリーのメンバーとのヘテロダイマーで、哺乳類動物の雌の受精率を減少させ、雄の精子形成を減少させるインヒビンの活性に基づく避妊調節剤として有効であると考えられる。充分量の他のインヒビン
- 20 の投与によって、哺乳動物の不妊を誘導可能である。一方、本発明の蛋白は、インヒビンbグループの他の蛋白サブユニットとのホモダイマーあるいはヘテロダイマーで、前脳下垂体の細胞からFSH放出を刺激するアクチビン分子の活性に基づいた治療的な不妊誘導として有効であると考えられる（米国特許4,798,885参照）。

- 25 本発明の蛋白は、牛、羊、および豚のような家畜の生涯出産能力可能な期間を延ばすために、性的に未熟なほ乳類動物における妊娠開始を早めることに有効であると考えられる。

## [走化性／化学運動性活性]

本発明の蛋白は、例えば、単球、好中球、T細胞、マスト細胞、好酸球、および内皮細胞、あるいはそのいずれかを含む哺乳動物の細胞に対して、例えば、ケモカインとして働く走化性／化学運動性活性を有すると考えられる。

- 5 走化性／化学運動性蛋白は、反応の望まれる部位へ、望まれる細胞集団を固定化あるいは引き寄せるため使用されることが可能である。走化性／化学運動性蛋白は、局所的な感染と同様に、創傷および他の外傷の治療に特別な優位性を提供する。例えば、リンパ球、単球、あるいは好中球を腫瘍あるいは感染部位へ引き寄せることは、腫瘍あるいは感染部位に対する免疫応答を改善する結果となると考えられる。

- 10 蛋白やペプチドは、もしそれが直接あるいは間接に特殊な細胞集団に対して指示された方向あるいは運動刺激が可能であれば、そのような細胞集団に対する走化性活性を保持している。望ましくは、その蛋白やペプチドは、細胞の指示された運動を直接的に刺激する活性を保持する。特別な蛋白がある
- 15 集団の細胞に対し走化性活性を保持するか否かは、どんな既知の細胞走化性のアッセイ法にそのような蛋白あるいはペプチドを使用しても容易に決定できる。

## [凝血および血栓活性]

- 本発明の蛋白は、凝血あるいは血栓活性も示すと考えられる。結果として、
- 20 そのような蛋白は、様々な凝固障害（血友病のような遺伝性障害を含む）の治療に有効であると予期される。あるいは、外傷、手術あるいは他の原因により生じた創傷の治療における凝固および他の凝血事象を促進させることが予期される。本発明の蛋白は、血栓の形成の溶解あるいは阻害、および血栓あるいは卒中等より生じる状態の治療および予防にも効果があると考えられる。

## [受容体／リガンド活性]

本発明の蛋白は、受容体、受容体／リガンドあるいは受容体／リガンドのインヒビターあるいはアゴニストとしての活性を示す可能性もある。そのよ

うな受容体およびリガンドの例として、サイトカイン受容体およびそのリガンド、受容体キナーゼおよびそのリガンド、受容体フォスファターゼおよびそのリガンド、細胞間相互作用に関連した受容体（Selectin、Integrin、およびそのリガンド、受容体キナーゼ等の細胞接着分子を含む）およびそのリガンド、および抗原提示、抗原認識、および細胞性および液性免疫反応の発達に係わる受容体／リガンドの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。受容体およびリガンドは、その相互作用に対する可能なペプチドあるいは小分子のインヒビターのスクリーニングにも有効である。本発明の蛋白（受容体およびリガンドの断片を含むが、制限されるものではない）は、それ自身受容体／リガンドの相互作用のインヒビターとして有効であると考えられる。

[その他の活性]

本発明の蛋白（ポリペプチド）は、以下に示す付加的な活性あるいは効果の一つあるいはそれ以上を示すと考えられる：細菌、ウィルス、カビ、および他の寄生虫を含む感染性の物質を殺傷する；身長、体重、髪の色、目の色、肌あるいは他の組織の色素沈着、あるいは例えば、胸部増量あるいは減量等の器官の大きさ等の身体的特徴を抑制あるいは促進する効果を及ぼす；食餌脂肪、蛋白、あるいは炭水化物の分解に効果を及ぼす；食欲、性欲、ストレス、認識（認識障害）、鬱病、暴力行動を含む行動特徴に効果を及ぼす；鎮痛効果あるいは他の痛みを減少させる効果を及ぼす；胚性幹細胞の造血系以外の他の系統への分化および増殖を促進する；および、酵素の場合その酵素の欠失を補い、また関連疾患を治療する。

上記活性を有する蛋白は、例えば、B細胞、T細胞、肥満細胞の増殖または細胞死、免疫グロブリンのクラススイッチ促進によるクラス特異的誘導、B細胞の抗体産生細胞への分化、顆粒球前駆細胞の増殖または分化、細胞死、単球・マクロファージ前駆細胞の増殖または分化、細胞死、好中球、単球・マクロファージ、好酸球、好塩基球の増殖または機能亢進、細胞死、巨核球前駆細胞の増殖または細胞死、好中球前駆細胞の増殖または分化、細胞死、

BまたはT前駆細胞の増殖または分化、細胞死、赤血球の産生促進、赤血球、好中球、好酸球、好塩基球、単球・マクロファージ、肥満細胞、巨核球前駆細胞の増殖支持、好中球、単球・マクロファージ、B細胞またはT細胞の遊走促進、胸腺細胞の増殖または細胞死、脂肪細胞の分化抑制、ナチュラルキラー細胞の増殖または細胞死、造血幹細胞の増殖または細胞死、幹細胞および各種造血前駆細胞の増殖抑制、間葉系幹細胞からの骨芽細胞、軟骨細胞への分化促進または増殖、細胞死、あるいは破骨細胞の活性化や単球から破骨細胞への分化促進による骨吸収の促進の作用を本発明のポリペプチドのみで、  
5 　　またリガンド・レセプター間の結合を介して、あるいは他の分子と相乗的に働くことにより有すると考えられる。  
10

　　また本発明のポリペプチドは神経系にも作用することが予測されるので、各種神経伝達物質作動性神経細胞への分化ならびにそれらの生存維持または細胞死、グリア細胞の増殖促進または細胞死、神経突起の伸展、神経節細胞の生存維持または細胞死、アストロサイトの増殖または分化促進または細胞死、末梢神経の増殖または生存維持、細胞死、シュワン細胞の増殖または細胞死、運動神経の増殖または生存維持、細胞死の作用もあると考えられる。  
15

　　さらに、本発明のポリペプチドは初期胚の発生過程において、外胚葉誘導作用による表皮、脳、背骨、神経の器官形成、中胚葉誘導作用による背索結合組織（骨、筋肉、腱）、血球細胞、心臓、腎臓、生殖巣の器官形成、あるいは内胚葉誘導作用による消化器系臓器（胃、腸、肝臓、膵臓）、呼吸器系（肺、気管）の形成に促進的または抑制的に作用すると考えられるとともに、  
20 　　生体においても上記器官の増殖あるいは増殖抑制作用を有すると考えられる。

　　したがって、本発明のポリペプチドはそれ自身で、免疫系または神経系もしくは骨代謝の機能の低下または亢進に関する疾患、または造血系細胞の発育不全または異常増殖、例えば、炎症性疾患（リウマチ、潰瘍性大腸炎等）、  
25 　　骨髓移植後の造血幹細胞の減少症、ガン、白血病に対する放射線照射または化学療法剤投与後の白血球、血小板、B細胞またはT細胞の減少症、貧血、感染症、ガン、白血病、AIDS、骨代謝異常（骨粗鬆症等）、各種変性疾

患（アルツハイマー病、多発性硬化症等）、あるいは神経損傷の予防または治療薬として用いることが期待される。

また、本発明のポリペプチドは、外胚葉、中胚葉または内胚葉由来器官の分化または増殖作用を有すると考えられるので、各器官（表皮、骨、筋肉、  
5 腱、心臓、腎臓、胃、腸、肝臓、膵臓、肺、気管等）の組織修復剤として用いることも期待される。

また、本発明のポリペプチドのポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いて、生体における該ポリペプチドの定量が行なえ、これによって該ポリペプチドと疾患との関係の研究あるいは疾患の診断等に利用することができる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は該ポリペプチド  
10 あるいはその断片を抗原として用いて常法により作製することができる。

また本発明のポリペプチド（好ましくはその細胞外ドメインのポリペプチド）を用いることにより、例えばアフィニティーカラムを作製して、本ポリペプチドと結合する既知または未知の蛋白（リガンド）の同定、精製あるいはその遺伝子クローニングを行なうことができる。  
15

また、本発明のポリペプチド（好ましくはその膜貫通領域または細胞内ドメインのポリペプチド）を用いて、例えばウエストーウエスタン法により、またはそのcDNA（好ましくは、該ポリペプチドの膜貫通領域または細胞内ドメインをコードするcDNA）を用いて、例えば酵母2-ハイブリッド  
20 法により該ポリペプチドと細胞質内で相互作用する下流のシグナル伝達分子の同定、遺伝子クローニングを行なうこともできる。

さらに本発明のポリペプチドを用いることによって、本ポリペプチドレセプターアゴニスト、アンタゴニストおよび受容体-シグナル伝達分子間の阻害剤等のスクリーニングを行なうこともできる。

25 本発明のcDNAは、多大な有用性が期待される本発明のポリペプチドを生産する際の重要かつ必須の鋳型となるだけでなく、遺伝病の診断や治療（遺伝子欠損症の治療またはアンチセンスcDNA（mRNA）によって、ポリペプチドの発現を停止させることによる治療等）に利用できる。また、

本発明の cDNA をプローブとしてジェノミック (genomic) cDNA を分離できる。同様に、本発明 cDNA と相同性の高いヒトの関連ポリペプチドの遺伝子、またマウス以外の生物における本発明ポリペプチドと相同性の高いポリペプチドの遺伝子を分離することも可能である。

5     〔医薬品への適用〕

前記の疾患に適応するために、本発明のポリペプチド、あるいは本発明のポリペプチドに対する抗体は通常、全身的又は局所的に、一般的には経口または非経口の形で投与される。好ましくは、経口投与、静脈内投与および脳室内投与である。

10     投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、成人一人あたり、一回につき、100  $\mu$ g から 100 mg の範囲で、一日一回から数回経口投与されるか、または成人一人あたり、一回につき、10  $\mu$ g から 100 mg の範囲で、一日一回から数回非経口投与される。

15     もちろん前記したように、投与量は、種々の条件により変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場合もある。

本発明化合物を投与する際には、経口投与のための固体組成物、液体組成物およびその他の組成物、非経口投与のための注射剤、外用剤、坐剤等として用いられる。

20

経口投与のための固体組成物には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。カプセルには、ソフトカプセルおよびハードカプセルが含まれる。

このような固体組成物においては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤（例えば、ラクトース、マンニトール、グルコース、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）と混合される。

25

組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加物、例えば、潤滑剤

(ステアリン酸マグネシウム等)、崩壊剤(繊維素グリコール酸カルシウム等)、安定化剤(ヒト血清アルブミン、ラクトース等)、溶解補助剤(アルギニン、アスパラギン酸等)を含有していてもよい。

錠剤または丸剤は、必要により白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセル  
5 ロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等の胃溶性あるいは腸溶性のフィルムで被膜してもよいし、また2以上の層で被膜してもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも包含される。

経口投与のための液体組成物は、薬学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般に用いられる不活性な希釈  
10 剤(例えば、精製水、エタノール等)を含んでいてもよい。この様な組成物は、不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

経口投与のためのその他の組成物としては、ひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、それ自体公知の方法により処方されるスプレー剤が含まれる。  
15 この組成物は不活性な希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムのような安定剤と等張性を与えるような安定化剤、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムあるいはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。スプレー剤の製造方法は、例えば米国特許第2,868,691号および同第3,095,355号明細書に詳しく記載されている。

20 本発明による非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性または非水性の溶液剤、懸濁剤としては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤と混合される。水性の希釈剤としては、例えば注射用蒸留水および生理食塩水が挙げられる。非水性の希釈剤としては、例えばプロピレングリコ  
25 ール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80(登録商標)等が挙げられる。

このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ラクトース等)、溶解補助剤(例えば、



アルギニン、アスパラギン酸等)のような補助剤を含んでいてもよい。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範  
5 囲を制限するものではない。また以下の説明中、特に記載がなければ、  
Molecular Cloning (Sambrook, J., Fritsh, E. F. および Maniatis, T. 著、Cold  
Spring Harbor Laboratory Press より 1989 年に発刊) または Current  
Protocol in Molecular Biology (F. M. Ausubel ら編、John Wiley &  
Sons, Inc. より発刊) の記載に準じて行なった。キット等の商品を使用した場  
10 合には、そこに添付されたている使用方法に従って行なった。

#### 実施例

##### [細胞の調製]

初めにマウス E S (Embryonic Stem) 細胞株 D 3 (T. C. Doetschman, et. al.,  
15 J. Embryol. Exp. Morphol., 87, 27, 1985 参照) を D M E M, 15 % F C S,  
L I F の培養液を用いて、マイトマイシン C 処理した Embryonic Fibroblast  
細胞上で未分化な状態を保って培養を行なった。10 cm ディッシュ内にコン  
フルエントにした o p / o p マウス新生仔頭蓋冠由来ストローマ細胞株  
O P 9 細胞 (H. Kodama, et. al., Exp. Hematol., 22, 979-984, 1994 参照) 上に  
20 トリプシン処理して単一にした E S 細胞  $1 \times 10^5$  個 / w e l l を均一になる  
ように撚き、a - M E M, 20 % F C S の培養液を用いて 37℃, 5 %  
CO<sub>2</sub> で培養を行ない、血液細胞への分化誘導を行なった (T. Nakano, et. al.,  
Science, 265, 1098-1101, 1994 参照)。2 日目に培養液を半量交換した後、  
5 日目に全細胞を回収した。

##### 25 [p o l y (A) <sup>+</sup>RNA の調製]

T R I z o l 試薬 (TRIzol Reagent, 登録商標, GIBCOBRL 社より販売) を  
用いて全 RNA を抽出し、Oligotex - d T 3 0 < S u p e r > (登録商標,  
宝酒造より販売) を用いて p o l y (A) <sup>+</sup>RNA を精製した。

[哺乳動物細胞シグナルシーケンスストラップ (SST) cDNAライブラリーの調製]

このmRNAを鋳型としてSalI部位を連結したランダム9mer:  
5' - GAGACGGTAATACGATCGACAGTAGGTCGAC  
5 NNNNNNNNN - 3' (配列番号16) をプライマーとして逆転写酵素  
SuperScript (登録商標、GIBCOBRLより販売) を用いて1本鎖cDNAを合成  
し、Gubler & Hoffmanらの方法により2本鎖cDNAを合成した。次に  
DNAライゲーションキット Ver. 2 (ligation kit Ver. 2, 商品名、宝酒造  
より販売) を用いて2本鎖cDNAの両端にEcoRIアダプター: 5' -  
10 CCGCGAATTCTGACTAAGTATT-3' (配列番号17)  
および3' - CAGGCGCTTAAGACTGATTGACTAA-5'  
(配列番号18) を結合した後、アガロース電気泳動により400~600  
bpのcDNAを切り出して分画し、Forwardのプライマー: 5' - CCGC  
GAATTCTGACTAAGTATT-3' (配列19) とReverseの  
15 プライマー: 5' - GACGGTAATACGATCGACAGTAGG-  
3' (配列番号20) を用いて、95℃, 30秒, 55℃, 1分, 72℃,  
1分, 25サイクルの条件でPCRを行ない、cDNAを増幅した。その  
cDNAをEcoRIとSalIで消化した後、アガロース電気泳動により  
400~600bpのcDNAを切り出して分画し、pUC-SRα-  
20 Tac (国際公開番号96/01843号明細書に詳細が記載されている。) の  
EcoRI/SalI部位に連結し、大腸菌DH5αに形質転換して、動物  
細胞SST用のcDNAライブラリーを得た。

[SSTによるスクリーニング]

特開平6-315380号明細書に記載された方法に準じて行なった。上記ライ  
25 ブラリーのコロニー計4,500個を125プール(約36コロニー/プール)に細  
分化した。各プールごとにプラスミドを調製し、DEAE-デキストラン  
(dextran) 法を用いてCos7細胞にトランスフェクトした。48時間後、  
細胞をディッシュからはがして、フルオレセイン・イソチオシアネートで

ラベルした抗ヒト T a c 抗体 (FITC-conjugated Monoclonal Mouse Anti Human Interleukin-2 Receptor Clone ACT-1, DAKOより販売) を用いて細胞表面の T a c に対する蛍光染色を行ない、蛍光顕微鏡下で陽性を示すプールを選択した。さらに陽性プールのコロニーを細分化し、単一クローンを得るまで同様の方法を繰り返した。

[S S T陽性クローンの塩基配列の決定]

次に各陽性クローンのインサート c D N A の塩基配列を決定した。塩基配列の決定は D N A ・シーケンシング・キット (DNA Sequencing kit) (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction) (商品名、Applied Biosystems Inc. より販売) を用いた蛍光ダイターミネーターサイクルシークエンス法で反応を行ない、自動 c D N A シークエンサー 3 7 3 (Applied Biosystems Inc.) で読み取りを行なった (以下、塩基配列決定はすべてこの方法で行なった。)。得られた塩基配列についてデータベースとの相同性検索を行なった結果、シグナルシークエンスを有する既知の蛋白質が 7 クローン (Apolipoprotein E, Osteopontin などの分泌蛋白質と PTPase-kappa などの膜蛋白質)、新規クローンが 1 7 クローンあることが明らかとなった。

[全長 c D N A のクローニングおよび塩基配列の決定]

新規 1 7 クローンの中で O H P 1 0 6 と名付けられたインサート長 4 4 4 b p のクローンに着目し、3' R A C E (Rapid Amplification of cDNA End) 法により全長 c D N A を単離した。3' R A C E 法は 3' R A C E システム (商品名、GIBCOBRL 社より販売) の方法に準じて行なった。上記の全 m R N A を鋳型にして 3' R A C E アダプタープライマー: 5' - G G C C A C G C G T C G A C T A C (T) 1 7 - 3' (配列番号 2 1) を用いて 1 本鎖 c D N A を合成した。次に 1 本鎖 c D N A を鋳型にして O H P 1 0 6 F 2 プライマー: 5' - C T C C C A T A T T G A C T G A A T C T G A G A A G C - 3' (配列番号 2 2) とユニバーサル・アンプリフィケーション (Universal Amplification) プライマー: 5' - G G C C A C G C G T C G A C T A C - 3' (配列番号 2 3) を用いて 9 5 ° C , 3 0 秒, 6 0 ° C , 3 0

秒、72℃、1分、30サイクルの条件でPCRを行なった。さらにこのPCR溶液を鋳型にしてOHP106F1プライマー：5'-AGTGGTTCTGCAACTCCTCC-3'（配列番号24）とUniversal Amplificationプライマー：5'-GGCCACGCGTCGACTAC-3'（配列番号25）で再度同条件でPCRを行ない、約530bpのcDNAが特異的に増幅されることを確認した。このcDNAをpGEM-T（商品名、Promegaより販売）に連結し、大腸菌DH5aに形質転換してプラスミドを調製した。初めに5'末端と3'末端の塩基配列を決定し、5'側にF1プライマーの配列と3'側にpoly(A)<sup>+</sup>配列が存在することを確認した。引き続き全長の塩基配列を決定し、配列番号3中に示す塩基配列を得た。さらにオープンリーディングフレームを決定し、配列番号2に示すアミノ酸翻訳領域および配列番号1に示す推定アミノ酸配列を得た。

核酸配列データベースに登録されている既知の核酸配列に対してBLASTNおよびFASTAにより、またアミノ酸配列データベースに登録されている既知のポリペプチドのアミノ酸配列に対してBLASTX、BLASTPおよびFASTAにより検索した結果、本発明のポリペプチドマウスOHP106およびそれをコードする核酸配列と一致する配列はなかった。さらに得られたアミノ酸配列の疎水性プロットによる解析から本発明のポリペプチドは膜貫通領域を持たないことが予想された。これらのことから、本発明のポリペプチドは、新規の分泌蛋白質であることが判明した。しかし、BLASTX、BLASTPおよびFASTAは、クローン、マウスOHP106（配列番号1のアミノ酸配列25～153間の領域）とニワトリの白血病ウィルス由来のガン遺伝子mybによって発現が誘導されるChicken MD-1（Pir Accession S42854のアミノ酸配列28～154間の領域）（O. Burk et. al. EMBO J. 10, 3713-3719参照）の間に有為な相同性があることを示した。これらの相同性に基づいて、マウスOHP106は、少なくともChicken MD-1と関連した活性を保持すると期待される。

## [ノザン解析]

未分化な状態のES細胞および上記の分化誘導を行なったES細胞より調製したpoly(A)<sup>+</sup>RNAを1%アガロース電気泳動にかけ、ナイロン膜にトランスファーした。つぎにランダム・プライマー・DNA・ラベリング  
5 キット(Random Primer DNA Labeling kit)(商品名、宝酒造より販売)を用いてマウスOHP106 cDNAを<sup>32</sup>P-dCTPでラベルし、50%ホルムアミド、5×SSPE 0.1% SDS、2×Denhardt's, 0.1mg/mlサーモン・スperm DNA中42℃で15時間ナイロン膜とハイブリダイズさせた。0.2×SSC、0.1% SDS、65℃でフリーの  
10 <sup>32</sup>P-dCTPを除去した後、48時間露光し、BAS2000(富士フィルム)を用いて解析を行なった。その結果、分化誘導を行なったES細胞のmRNAにのみ600bp付近にバンドが認められた。このことから配列番号3中に示されたcDNAはほぼ全長であること、およびマウスOHP106のmRNAは分化誘導時に発現することが示された。

## 15 [マウスOHP106関連遺伝子の塩基配列の決定]

マウスOHP106の塩基配列のオープンリーディングフレーム内に22bpの挿入配列を有するマウス腎臓cDNAライブラリー由来のクローン(cloneID 520548)をIMAGE Consortiumより購入し、マウスOHP106Kと命名した。マウスOHP106と同様の方法で全塩基配列を決定し、配列  
20 番号6中に示す配列を得た。さらにオープンリーディングフレームを決定し、配列番号5に示すアミノ酸配列翻訳領域および配列番号4に示す推定アミノ酸配列を得た。

またマウスOHP106の塩基配列の一部と相同性を有するヒト妊娠子宮cDNAライブラリー由来のクローン(CloneID 489463)をIMAGE  
25 Consortium社より購入し、ヒトOHP106と命名した。マウスOHP106と同様の方法で全塩基配列を決定し、配列番号9に示す配列を得た。さらにオープンリーディングフレームを決定し、配列番号8に示すアミノ酸翻訳領域および配列番号7に示す推定アミノ酸配列を得た。

さらにマウスOHP106のアミノ酸配列の一部と有意な相同性を有するマウス13.5、14.5日胎児cDNAライブラリー由来のクローン(ClineID 402964)およびヒト胎児肝臓、腎臓cDNAライブラリー由来のクローン(CloneID 111816)をIMAGEConsortium社より購入し、それぞれマウスOHP  
5 106HおよびヒトOHP106Hと命名した。マウスOHP106と同様の  
方法で全塩基配列を決定し、配列番号12中および15中に示す配列を得  
た。さらにオープンリーディングフレームを決定し、配列番号11および1  
4に示すアミノ酸翻訳領域および配列番号10および13に示す推定アミノ  
酸配列を得た。相同性検索の結果、OHP106のアミノ酸をコードする領  
10 域はマウスーヒト間においてcDNAレベルで76%、アミノ酸レベルで  
64%一致していた。またOHP106Hのマウスーヒト間の相同性は  
cDNAレベルで77%、アミノ酸レベルで67%一致していた。またヒト  
OHP106-OHP106Hの相同性はcDNAレベルで49%、アミノ  
酸レベルで23%一致していた。

15 [哺乳動物細胞を用いたマウスOHP106融合蛋白質の発現]

OHP106の翻訳開始点ATGを含むXbaI-マウスOHP106F  
プライマー: 5'-CGTCTAGACGGAGATATTAAATCAT  
GTTGC-3' (配列番号26)と翻訳終止点TGAを含むXbaI-  
FLAG-マウスOHP106Hプライマー: 5'-CGTCTAGATC  
20 ACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCATTGACATC  
ACGGCGGTGAATGAT-3' (配列番号27)または同じ  
XbaI-マウスOHP106Fプライマーと翻訳終止点TGAを含む  
XbaI-6His-マウスOHP106Hプライマー: 5'-CGTCT  
AGATCAGTGATGGTGATGGTGATGATTGACATCA  
25 CGGCGGTGAATGAT-3' (配列番号28)の組み合わせで3'  
RACE時に調製した1本鎖cDNAを鋳型としてPCRを行ない、増幅さ  
れたcDNAをXbaIで消化後、哺乳動物細胞用発現ベクターpEF-  
BOS (S. Mizushima et. al. Nucleic Acid Res., 18, 5322)のXbaI部

位に連結して、OHP106蛋白のC末端にFLAG (AspTyrLys AspAspAspLys) からなるペプチド) または6個のHis残基をタグとしてつけた融合蛋白質を発現させるバクターを構築した。プラスミドを調製してインサートcDNAの塩基配列に変異がないことを確認した。

- 5 得られたプラスミドをリポフェクチン (商品名、GIBCOBRLより販売) を用いてCos7細胞に導入した。24時間後無血清培地に交換して72時間培養を行なった。細胞上清を回収後セントリプレッシャー10 (商品名、Amicon社より販売) にて約10倍に濃縮し、SDS-PAGEを行なった。蛋白を
- 10 アクリルアミドゲルからイモビロンP (PVDF膜、商品名、ミリポア社より販売) にトランスファーし、FLAG融合蛋白質は抗FLAG M2モノクローナル抗体 (イーストマン・コダック社より販売) と西洋ワサビペルオキシダーゼ結合プロテインAを用いて、また6xHis残基融合蛋白質は西洋ワサビペルオキシダーゼ結合N-NTA (商品名、QIAGENより販売) を用いて発色させて、マウスOHP106融合蛋白質の発現を検出した。
- 15 [哺乳動物細胞を用いたマウスOHP106およびその関連遺伝子 (以下マウスOHP106等と略記する。) の蛋白発現]

- 得られたマウスOHP106等の全長cDNAを哺乳動物細胞用発現ベクターpED6 (Kaufman et al., Nucleic Acids Res. 19, 4485-4490 (1991) 参照) のXhoI (またはEcoRI) -NotI部位に連結し、マウスOHP
- 20 P106等の蛋白質を発現させるベクターを構築した。得られたプラスミドをリポフェクチン (商品名、GIBCOBRLより販売) を用いてCos7細胞に導入した。24時間後にMetおよびCysフリーの培地に交換した後、<sup>35</sup>S-Metおよび<sup>35</sup>S-Cysを添加して5時間培養を行なった。細胞上清を回収後、セントリコン10 (商品名、Amiconより販売) にて約10倍
- 25 に濃縮し、SDS-PAGEを行なった。アクリルアミドゲルを乾燥させた後、マウスOHP106等の蛋白発現をBAS2000を用いて検出した。すなわち、イメージング・プレート (富士 (Fuji) イメージング・プレート TYPE-III) に露光し、イメージング・アナライザー (富士 (Fuji) イメージ

グ・アナライザーBAS 2000システム)にて読取り、解析し、プリンター (Fuji Pictography 3000) にて打ち出した。一例としてマウスOHP 106Hの発現を図1に示す。ベクターpED6のみを導入したCos7細胞と比較してマウスOHP 106HcDNAを導入したCos7細胞の上清

5 にのみ20kDa付近にバンドが認められ、マウスOHP 106H蛋白の発現が確認できた。

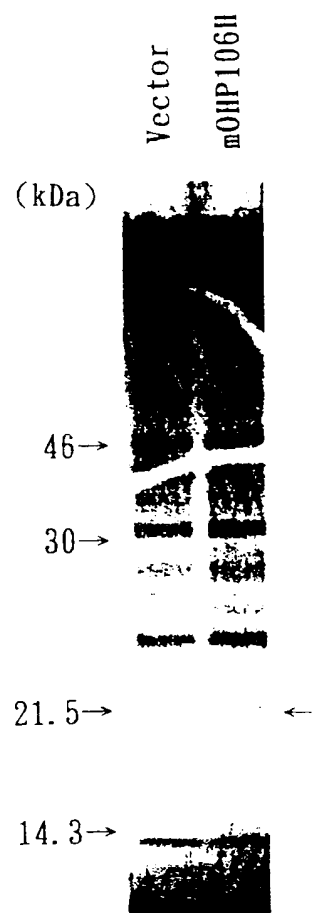


## 請求の範囲

1. 実質的に純粋な形である配列番号 1、4、7、10 または 13 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはそのホモログ、そのフラ  
5 グメントまたはそのフラグメントのホモログからなるポリペプチド。
2. 配列番号 1、4、7、10 または 13 で示されるアミノ酸配列からなる請求の範囲第 1 項記載のポリペプチド。
- 10 3. 請求の範囲第 1 項に記載されたポリペプチドをコードする cDNA。
4. 配列番号 2、5、8、11 または 14 で示される塩基配列を有する請求の範囲第 3 項記載の cDNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメントからなる cDNA。
- 15 5. 配列番号 3、6、9、12 または 15 中に示される塩基配列を有する請求の範囲第 3 項記載の cDNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメントからなる cDNA。
- 20 6. 請求の範囲第 3 項から第 5 項のいずれかの項に記載の cDNA からなる複製または発現ベクター。
7. 請求の範囲第 6 項記載の複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞。
- 25 8. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載されたポリペプチドを発現させるための条件下で請求の範囲第 7 記載の宿主細胞を培養することからなる請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のポリペプチドの製造方法。

9. 請求の範囲第1項または第2項に記載されたポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体。
10. 請求の範囲第1項または第2項に記載されたポリペプチドまたは請求の範囲第9項記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および／または担体を含有することを特徴とする薬学的組成物。

第 1 図



## 配列表

## Sequence Listing

<110> ONO Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Novel polypeptide, cDNA coding the polypeptide and use thereof

<130> ONF-2793PCT

<150> JP 9-274673

<151> 1997-10-7

<160> 28

<210> 1

<211> 160

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

```

Met Leu Pro Phe Ile Leu Phe Ser Thr Leu Leu Ser Pro Ile Leu Thr
-16 -15                -10                -5
Glu Ser Glu Lys Gln Gln Trp Phe Cys Asn Ser Ser Asp Ala Ile Ile
  1              5              10              15
Ser Tyr Ser Tyr Cys Asp His Leu Lys Phe Pro Ile Ser Ile Ser Ser
      20              25              30
Glu Pro Cys Ile Arg Leu Arg Gly Thr Asn Gly Phe Val His Val Glu
      35              40              45
Phe Ile Pro Arg Gly Asn Leu Lys Tyr Leu Tyr Phe Asn Leu Phe Ile
      50              55              60
Ser Val Asn Ser Ile Glu Leu Pro Lys Arg Lys Glu Val Leu Cys His
      65              70              75              80
Gly His Asp Asp Asp Tyr Ser Phe Cys Arg Ala Leu Lys Gly Glu Thr
              85              90              95

```

Val Asn Thr Ser Ile Pro Phe Ser Phe Glu Gly Ile Leu Phe Pro Lys  
                   100                  105                  110  
 Gly His Tyr Arg Cys Val Ala Glu Ala Ile Ala Gly Asp Thr Glu Glu  
                   115                  120                  125  
 Lys Leu Phe Cys Leu Asn Phe Thr Ile Ile His Arg Arg Asp Val Asn  
                   130                  135                  140

<210> 2

<211> 480

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

```

aigtggccat ttattctctt ttgacgcctg ctctctccca tatgaciga atctgagaag   60
caacagtggt tctgcaactc ctccgaigca attatttctt acagttattg tgatcacttg   120
aaattcccta ttcaatttag ttctgaaccc tgcataagac tgagggaac caatggattt   180
gtgcatgttg agttcattcc aagaggaaac ttaaaatatt tataattcaa cctattcatc   240
agtgtcaact ccatagagtt gccgaagcgt aaggaagttc tgtgccatgg acatgaigat   300
gactattctt ttgcagagc tctgaaagga gagactgtga atacatcaat accattctct   360
ttcgaggga tactatttcc taagggccat tacagaigtg ttgcagaagc tattgctggg   420
gatactgaag aaaagctctt ctgtttgaa ttcccatca ttaccgccg tgatgtcaat   480

```

<210> 3

<211> 608

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (23)... (502)

<220>

<221> sig peptide

<222> (23)... (70)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat peptide

&lt;222&gt; (71).. (502)

&lt;400&gt; 3

aaagtatcgg agatattaaa tc atg ttg cca ttt att ctc ttt tgc acg ctg 52

Met Leu Pro Phe Ile Leu Phe Ser Thr Leu

-16 -15

-10

ctt tct ccc ata ttg act gaa tct gag aag caa cag tgg ttc tgc aac 100

Leu Ser Pro Ile Leu Thr Glu Ser Glu Lys Gln Gln Trp Phe Cys Asn

-5

1

5

10

tcc tcc gat gca att att tcc tac agt tat tgt gat cac ttg aaa ttc 148

Ser Ser Asp Ala Ile Ile Ser Tyr Ser Tyr Cys Asp His Leu Lys Phe

15

20

25

cct att tca att agt tct gaa ccc tgc ata aga ctg agg gga acc aat 196

Pro Ile Ser Ile Ser Ser Glu Pro Cys Ile Arg Leu Arg Gly Thr Asn

30

35

40

gga ttt gtg cat gtt gag ttc att cca aga gga aac tta aaa tat tta 244

Gly Phe Val His Val Glu Phe Ile Pro Arg Gly Asn Leu Lys Tyr Leu

45

50

55

tat ttc aac cta ttc atc agt gtc aac tcc ata gag ttg ccg aag cgt 292

Tyr Phe Asn Leu Phe Ile Ser Val Asn Ser Ile Glu Leu Pro Lys Arg

60

65

70

aag gaa gtt ctg tgc cat gga cat gat gat gac tat tct ttt tgc aga 340

Lys Glu Val Leu Cys His Gly His Asp Asp Asp Tyr Ser Phe Cys Arg

75

80

85

90

gct ctg aaa gga gag act gtg aat aca tca ata cca ttc tct ttc gag 388

Ala Leu Lys Gly Glu Thr Val Asn Thr Ser Ile Pro Phe Ser Phe Glu

95

100

105

gga ata cta ttt cct aag ggc cat tac aga tgt gtt gca gaa gct att 436

Gly Ile Leu Phe Pro Lys Gly His Tyr Arg Cys Val Ala Glu Ala Ile

110

115

120

gct ggg gat act gaa gaa aag ctc ttc tgt ttg aat ttc acc atc att 484

Ala Gly Asp Thr Glu Glu Lys Leu Phe Cys Leu Asn Phe Thr Ile Ile

125

130

135

cac cgc cgt gat glc aat tagaataatgc tgaatacaca cacacacaca 532

His Arg Arg Asp Val Asn

140

cacacacaca cacacataatg tatatatata tttttttacc ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 592

aaaaaaaaaa aaaaaa

608

<210> 4

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Leu Pro Phe Ile Leu Phe Ser Thr Leu Leu Ser Pro Ile Leu Thr

-16 -15

-10

-5

Glu Ser Glu Lys Gln Gln Trp Phe Cys Asn Ser Ser Asp Ala Ile Ile

1

5

10

15

Ser Tyr Ser Tyr Cys Asp His Leu Lys Phe Pro Ile Ser Ile Ser Ser

20

25

30

Glu Pro Cys Ile Arg Leu Arg Gly Thr Asn Gly Phe Val His Val Glu

35

40

45

Phe Ile Pro Arg Gly Asn Leu Lys Tyr Leu Tyr Phe Asn Leu Phe Ile

50

55

60

Ser Val Asn Ser Ile Glu Leu Pro Lys Arg Lys Glu Val Leu Cys His

65

70

75

80

Gly His Asp Asp Asp Tyr Ser Phe Cys Arg Ala Leu Lys Gly Gly Tyr

85

90

95

Ala Ile

<210> 5

<211> 342

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 5

atgttgccat ttattctctt ttgcagctg cttctccca tattgactga atctgagaag 60

caacagtggg tctgcaactc ctccgaigca attatttccct acagtatttg tgalcacttg 120

aaattcccta ttccaattag ttctgaaccc tgcataagac tgagggggaac caaiggattt 180  
 gtgcatgttg agttcatlcc aagaggaaac ttaaaatatt tataatttcaa cctatlcatc 240  
 agtltcaact ccatagagtt gccgaagcgt aaggaagttc tgtgccatgg acatgaigat 300  
 gactatttctt ttgtcagagc tctgaaagga ggataigcta tt 342

<210> 6

<211> 630

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (23).. (364)

<220>

<221> sig peptide

<222> (23).. (70)

<220>

<221> mat peptide

<222> (71).. (364)

<400> 6

aaagtaicgg agatattaaa tc atg ttg cca ttt att ctc ttt tgc acg ctg 52

Met Leu Pro Phe Ile Leu Phe Ser Thr Leu

-16 -15

-10

ctt tct ccc ata ttg act gaa tct gag aag caa cag tgg ttc tgc aac 100

Leu Ser Pro Ile Leu Thr Glu Ser Glu Lys Gln Gln Trp Phe Cys Asn

-5

1

5

10

tcc tcc gat gca att att tcc tac agt tat tgt gat cac ttg aaa ttc 148

Ser Ser Asp Ala Ile Ile Ser Tyr Ser Tyr Cys Asp His Leu Lys Phe

15

20

25

cct att tca att agt tct gaa ccc tgc ata aga ctg agg gga acc aat 196

Pro Ile Ser Ile Ser Ser Glu Pro Cys Ile Arg Leu Arg Gly Thr Asn

30

35

40



gga ttt gtg cat gtt gag ttc att cca aga gga aac tta aaa tat tta 244  
 Gly Phe Val His Val Glu Phe Ile Pro Arg Gly Asn Leu Lys Tyr Leu  
           45                    50                    55  
 tat ttc aac cta ttc atc agt gtc aac tcc ata gag ttg ccg aag cgt 292  
 Tyr Phe Asn Leu Phe Ile Ser Val Asn Ser Ile Glu Leu Pro Lys Arg  
           60                    65                    70  
 aag gaa gtt ctg tgc cat gga cat gat gat gac tat tct ttt tgc aga 340  
 Lys Glu Val Leu Cys His Gly His Asp Asp Asp Tyr Ser Phe Cys Arg  
           75                    80                    85                    90  
 gct ctg aaa gga gga tat gct att tagaaaaat gagactgtga atacatcaat 394  
 Ala Leu Lys Gly Gly Tyr Ala Ile  
                                 95  
 accattctct ttgagggaa tactatttcc taagggccat tacagatgtg ttgcagaagc 454  
 tattgtctggg gatactgaag aaaagctctt ctgtttgaat ttccacctca ttccaccgccg 514  
 tgaatgtcaat tagaataatc tgaatacaca cacacacaca cacacacaca cacacataatg 574  
 tatatatata tttttttacc ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 630

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 160

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

Met Leu Pro Phe Leu Phe Phe Ser Thr Leu Phe Ser Ser Ile Phe Thr  
 -16 -15                                -10                                -5  
 Glu Ala Gln Lys Gln Tyr Trp Val Cys Asn Ser Ser Asp Ala Ser Ile  
           1                                5                                10                                15  
 Ser Tyr Thr Tyr Cys Asp Lys Met Gln Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Val  
                                 20                                25                                30  
 Asn Pro Cys Ile Glu Leu Lys Gly Ser Lys Gly Leu Leu His Ile Phe  
           35                                40                                45  
 Tyr Ile Pro Arg Arg Asp Leu Lys Gln Leu Tyr Phe Asn Leu Tyr Ile  
           50                                55                                60  
 Thr Val Asn Thr Met Asn Leu Pro Lys Arg Lys Glu Val Ile Cys Arg  
           65                                70                                75                                80

Gly Ser Asp Asp Asp Tyr Ser Phe Cys Arg Ala Leu Lys Gly Glu Thr  
                             85                            90                            95  
 Val Asn Thr Thr Ile Ser Phe Ser Phe Lys Gly Ile Lys Phe Ser Lys  
                             100                            105                            110  
 Gly Lys Tyr Lys Cys Val Val Glu Ala Ile Ser Gly Ser Pro Glu Glu  
                             115                            120                            125  
 Met Leu Phe Cys Leu Glu Phe Val Ile Leu His Gln Pro Asn Ser Asn  
                             130                            135                            140

<210> 8

<211> 480

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

atgttaccat ttctgttttt ttccaccttg ttctcttcca tatttactga agctcagaag 60  
 cagtattggg tctgcaactc atccgatgca agtatttcat acacctactg tgataaaaig 120  
 caatacccaa ttccaattaa tgttaacccc tgtatagaat tgaaggatc caaaggattt 180  
 ttgcacattt tctacattcc aaggagagat ttaaagcaat tatatttcaa tctctatata 240  
 actgtcaaca ccatgaatct tccaaagcgc aaagaagita ttgccgagg atctgaigac 300  
 gattactctt ttgcagagc tctgaaggga gagacttga atacaacaat atcattctcc 360  
 ttcaagggaa taaaattttc taagggaata tacaatgtg ttgttgaagc tatttciggg 420  
 agcccagaag aaatgctctt ttgcttggag ttgtcatcc tacaccaacc taattcaaat 480

<210> 9

<211> 539

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(501)

<220>

<221> sig peptide

<222> (22)..(69)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat peptide

&lt;222&gt; (70).. (501)

&lt;400&gt; 9

```

aagctttagga gatatatgaat c atg tta cca ttt ctg ttt ttt tcc acc ctg 51
Met Leu Pro Phe Leu Phe Phe Ser Thr Leu
-16 -15 -10

ttt tct tcc ata ttt act gaa gct cag aag cag tat tgg gtc tgc aac 99
Phe Ser Ser Ile Phe Thr Glu Ala Gln Lys Gln Tyr Trp Val Cys Asn
-5 1 5 10

tca tcc gat gca agt att tca tac acc tac tgt gat aaa atg caa tac 147
Ser Ser Asp Ala Ser Ile Ser Tyr Thr Tyr Cys Asp Lys Met Gln Tyr
15 20 25

cca att tca att aat gtt aac ccc tgt ata gaa ttg aaa gga tcc aaa 195
Pro Ile Ser Ile Asn Val Asn Pro Cys Ile Glu Leu Lys Gly Ser Lys
30 35 40

gga tta ttg cac att ttc tac att cca agg aga gat tta aag caa tta 243
Gly Leu Leu His Ile Phe Tyr Ile Pro Arg Arg Asp Leu Lys Gln Leu
45 50 55

tat ttc aat ctg tat ata act gtc aac acc atg aat ctt cca aag cgc 291
Tyr Phe Asn Leu Tyr Ile Thr Val Asn Thr Met Asn Leu Pro Lys Arg
60 65 70

aaa gaa gtt att tgc cga gga tct gat gac gat tac tct ttt tgc aga 339
Lys Glu Val Ile Cys Arg Gly Ser Asp Asp Asp Tyr Ser Phe Cys Arg
75 80 85 90

gct ctg aag gga gag act gtg aat aca aca ala tca ttc tcc ttc aag 387
Ala Leu Lys Gly Glu Thr Val Asn Thr Thr Ile Ser Phe Ser Phe Lys
95 100 105

gga ata aaa ttt tct aag gga aaa tac aaa tgt gtt gtt gaa gct att 435
Gly Ile Lys Phe Ser Lys Gly Lys Tyr Lys Cys Val Val Glu Ala Ile
110 115 120

tct ggg agc cca gaa gaa atg ctg ttt tgc ttg gag ttt gtc atc cta 483
Ser Gly Ser Pro Glu Glu Met Leu Phe Cys Leu Glu Phe Val Ile Leu
125 130 135

```

cac caa cct aat tca aat tagaataaat tgaglatitta aaaaaaaaaa aaaaaaaa 539

His Gln Pro Asn Ser Asn

140

<210> 10

<211> 162

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Met Asn Gly Val Ala Ala Ala Leu Leu Val Trp Ile Leu Thr Ser Pro

-19 -15 -10 -5

Ser Ser Ser Asp His Gly Ser Glu Asn Gly Trp Pro Lys His Thr Ala

1 5 10

Cys Asn Ser Gly Gly Leu Glu Val Val Tyr Gln Ser Cys Asp Pro Leu

15 20 25

Gln Asp Phe Gly Leu Ser Ile Asp Gln Cys Ser Lys Gln Ile Gln Ser

30 35 40 45

Asn Leu Asn Ile Arg Phe Gly Ile Ile Leu Arg Gln Asp Ile Arg Lys

50 55 60

Leu Phe Leu Asp Ile Thr Leu Met Ala Lys Gly Ser Ser Ile Leu Asn

65 70 75

Tyr Ser Tyr Pro Leu Cys Glu Glu Asp Gln Pro Lys Phe Ser Phe Cys

80 85 90

Gly Arg Arg Lys Gly Glu Gln Ile Tyr Tyr Ala Gly Pro Val Asn Asn

95 100 105

Pro Gly Leu Asp Val Pro Gln Gly Glu Tyr Gln Leu Leu Leu Glu Leu

110 115 120 125

Tyr Asn Glu Asn Arg Ala Thr Val Ala Cys Ala Asn Ala Thr Val Thr

130 135 140

Ser Ser

<210> 11

<211> 486

<212> DNA

<213> Mus musculus

&lt;400&gt; 11

atgaatggig tgcagcigc cciccitlig iggatitiga cttctccgag cagcagigac 60  
 catggcagcg aaaatgglig gcccaagcac acggccigca acagiggggg ctiggaagia 120  
 gcttaccaga gctigatcc cttaacagat ttggcccttt ccatigacca gigticcaag 180  
 cagatccaal caaatctcaa cattagattt ggcatcaltc tgagacagga tatcagaaag 240  
 ctgtttctgg acataacct gatggcaaaa ggcctcttct tctgaacta ctcctatccc 300  
 ctltigaggg aggaccagcc caagtctca ttctigggaa gaagaaaagg agaacagata 360  
 tactatgccg gccctgtcaa taaccttgga cttaatgtt cacagggaga atatcagctc 420  
 ttgttggaac tgtacaatga aaaccgtgct actgtggctt gtgccaatgc cactgtcacc 480  
 tcttcc 486

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 996

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (91).. (576)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig peptide

&lt;222&gt; (91).. (147)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat peptide

&lt;222&gt; (148).. (576)

&lt;400&gt; 12

gcggcagcag gactccttca gggggaggac gagcttcgga ggcttttita ttgggcctggc 60  
 ttaccatitg gcacacacaa cccctctgcc atg aat ggt gtc gca gct gcc ctg 114  
 Met Asn Gly Val Ala Ala Ala Leu  
 -19 -15  
 ctt gtg igg att ctg act tct ccg agc agc agt gac cat ggc agc gaa 162  
 Leu Val Trp Ile Leu Thr Ser Pro Ser Ser Ser Asp His Gly Ser Glu  
 -10 -5 1 5

```

aat ggt tgg ccc aag cac acg gcc tgc aac agt ggg ggc ttg gaa gta 210
Asn Gly Trp Pro Lys His Thr Ala Cys Asn Ser Gly Gly Leu Glu Val
      10              15              20
gtc tac cag agc tgt gat ccc tta cag gat ttt ggc ctt tcc att gac 258
Val Tyr Gln Ser Cys Asp Pro Leu Gln Asp Phe Gly Leu Ser Ile Asp
      25              30              35
cag tgt tcc aag cag atc caa tca aat ctc aac att aga ttt ggc atc 306
Gln Cys Ser Lys Gln Ile Gln Ser Asn Leu Asn Ile Arg Phe Gly Ile
      40              45              50
att ctg aga cag gat atc aga aag ctg ttt ctg gac ata act ctg atg 354
Ile Leu Arg Gln Asp Ile Arg Lys Leu Phe Leu Asp Ile Thr Leu Met
      55              60              65
gca aaa ggc tct tct att ctg aac tac tcc tat ccc ctt tgt gag gag 402
Ala Lys Gly Ser Ser Ile Leu Asn Tyr Ser Tyr Pro Leu Cys Glu Glu
      70              75              80              85
gac cag ccc aag ttc tca ttc tgt gga aga aga aaa gga gaa cag ata 450
Asp Gln Pro Lys Phe Ser Phe Cys Gly Arg Arg Lys Gly Glu Gln Ile
      90              95              100
tac tat gcc ggc cct gtc aat aac cct gga ctt gat gtt cca cag gga 498
Tyr Tyr Ala Gly Pro Val Asn Asn Pro Gly Leu Asp Val Pro Gln Gly
      105              110              115
gaa tat cag ctg ttg ctg gaa ctg tac aat gaa aac cgt gct act gtg 546
Glu Tyr Gln Leu Leu Leu Glu Leu Tyr Asn Glu Asn Arg Ala Thr Val
      120              125              130
gct tgt gcc aat gcc act gtc acc tcc tcc tgagcatggt ctgcaaggaa 596
Ala Cys Ala Asn Ala Thr Val Thr Ser Ser
      135              140
atgcacagta aactcaatct caggggaccc caaggteccct ggactcaccct agctgcaaga 656
accactigata accaagagag gccttacaaa gaaatttctt ggggtcact ctccgatct 716
tagctccagg gacagatgtt cccagacceca acagatglaa taaaccctca aaaactatct 776
atttcigagg accctigagta gtcttgaagc cctatgttag tacccttccct tatgtaattt 836
cgtttcatca aagctacttc ctggcctgct ccttagcaac acttccctiga agttgccctgg 896
gatgtaaaaa ataaaaataaa ataaaaataaa ataaaaataaa ataaaaataaa atgaaatgaa 956
aaataaaataa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 996

```

```
<400> 14
atgaagggtt tcacagccac tcctctcttc tggactctga ttttcccag ctgcagtggg 60
ggcggcggig ggaaagccig gcccacacac gttgctctga gcgacagcgg ctltggaagt 120
```

cctaccaga gttgcatcc attacaagat ttggccttt cgttgaaaa ggttccaag 180  
 caattaaaa caaatatcaa cattagattt ggaattatc tgagagagga catcaaagag 240  
 cttttcttg acctagctct catgtctcaa ggctcatctg ttltgaattt ctcctatccc 300  
 atctgtgagg cggctctgcc caagtctct ttctgttgaa gaaggaaagg agagcagatt 360  
 tactatgctg ggccgtgcaa taatccigaa ttactatc ctcagggaga ataccaggtt 420  
 ttgttggaac tgtacactga aaaacggccc accgtggcct gtgccaatgc tactatcatg 480  
 tgcctc 486

<210> 15

<211> 877

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (16).. (501)

<220>

<221> sig peptide

<222> (16).. (75)

<220>

<221> mat peptide

<222> (76).. (501)

<400> 15

cggcacgagc ccacc atg aag ggt ttc aca gcc act ctc ttc ctc tgg act 51  
 Met Lys Gly Phe Thr Ala Thr Leu Phe Leu Trp Thr  
 -20 -15 -10  
 ctg att ttt ccc agc tgc agt gga ggc ggc ggt ggg aaa gcc tgg ccc 99  
 Leu Ile Phe Pro Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Gly Lys Ala Trp Pro  
 -5 1 5  
 aca cac gtc gtc tgt agc gac agc ggc ttg gaa gtc ctc tac cag agt 147  
 Thr His Val Val Cys Ser Asp Ser Gly Leu Glu Val Leu Tyr Gln Ser  
 10 15 20



tgc gat cca tta caa gat ttt ggc ttt tct gtt gaa aag tgt tcc aag 195  
 Cys Asp Pro Leu Gln Asp Phe Gly Phe Ser Val Glu Lys Cys Ser Lys  
 25 30 35 40  
 caa tta aaa tca aat atc aac att aga ttt gga att att ctg aga gag 243  
 Gln Leu Lys Ser Asn Ile Asn Ile Arg Phe Gly Ile Ile Leu Arg Glu  
 45 50 55  
 gac atc aaa gag ctt ttt ctt gac cta gct ctc atg tct caa ggc tca 291  
 Asp Ile Lys Glu Leu Phe Leu Asp Leu Ala Leu Met Ser Gln Gly Ser  
 60 65 70  
 tct gtt ttg aat ttc tcc tat ccc atc tgt gag gcg gct ctg ccc aag 339  
 Ser Val Leu Asn Phe Ser Tyr Pro Ile Cys Glu Ala Ala Leu Pro Lys  
 75 80 85  
 ttt tct ttc tgt gga aga agg aaa gga gag cag att tac tat gct ggg 387  
 Phe Ser Phe Cys Gly Arg Arg Lys Gly Glu Gln Ile Tyr Tyr Ala Gly  
 90 95 100  
 cct gtc aat aat cct gaa ttt act att cct cag gga gaa tac cag gtt 435  
 Pro Val Asn Asn Pro Glu Phe Thr Ile Pro Gln Gly Glu Tyr Gln Val  
 105 110 115 120  
 ttg ctg gaa ctg tac act gaa aaa cgg tcc acc gtg gcc tgt gcc aat 483  
 Leu Leu Glu Leu Tyr Thr Glu Lys Arg Ser Thr Val Ala Cys Ala Asn  
 125 130 135  
 gct act atc atg tgc tcc tgactgtggc ctgtagcaaa aatcacagcc 531  
 Ala Thr Ile Met Cys Ser  
 140  
 agctgcatct cgtgggacct ccaagctcct ctgactgaac ctactgtggg aggagaagca 591  
 gctgatgaca gagagaggct ctacaaagaa gcgcccccaa agaglgcagc tgcataat 651  
 agtcccagga ccagacatcc ccagactcca cagaigtaal gaagtcctcg aatgtatctg 711  
 ttctaaagga gctcttggc agtctttaag cagtcttgag ggtccatcct ttctctctaa 771  
 ttggctgcct cccaccagac tcacctgctt ttaactttt taggagtgtc tcttcacagt 831  
 taccaagaat aaagaaagct ggccacccaa aaaaaaaaaa aaaaaa 877

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<221> difference

<222> (32).. (40)

<223> SalI-random 9mer to synthesize a single strand cDNA

<400> 16

gagacggtaa tacgacgac agtaggtcga cnnnnnnnnn

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> EcoRI adapter

<400> 17

ccgcgaattc tgactaactg att

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> EcoRI adapter

<400> 18

aatcagttag tcagaattcg cggac

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Forward Primer

<400> 19

ccgcgaattc tgactaactg att

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Reverse Primer

<400> 20

gacggttaata cgatcgacag tagg

<210> 21

<211> 34

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> 3'Race adapter primer

<400> 21

ggccacgcgt cgactacitl llllllllll tlll

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> OHP106F2 primer

<400> 22

ctcccatatt gactgaatct gagaagc

<210> 23

<211> 17

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Universal Amplification primer

<400> 23

ggccacgcgt cgactac

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> OHP106F1 primer

<400> 24

agtggttcgt caactcctcc

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Universal Amplification primer

<400> 25

ggccacgcgt cgactac

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> XbaI-mouse OHP106F primer

<400> 26

cgctctagacg gagatattaa atcatgttgc

<210> 27

<211> 59

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> XbaI-FLAG-mouse OHP106H primer

<400> 27

cgctctagatc acttgccttc gtcgtccttg tagtcatlga catcacggcg gigaatgat

<210> 28

<211> 53

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> XbaI-6His-mouse OHP106H primer

<400> 28

cgctctagatc agtgaatggcg atggatgaat ttgacatcac ggcggtgaat gat

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04515

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. <sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N15/63, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18, C12P21/08, A61K38/17 // (C12P21/02, C12R1:91) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. <sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N15/63, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18, C12P21/08, A61K38/17 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	Nature <u>377</u> [6547 suppl] (1995) Adams M.D. et al., "Initial assessment if human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence" p.3-174	<u>1-9</u> 10
P, X	WO, 98/28421, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 2 July, 1998 (02. 07. 98) & AU, 9858027, A	1-10
<u>P, X</u> P, A	J. Immunol. <u>161</u> [3] (1998 Aug) Miyake K. et al., "Mouse MD-1, a molecule that is physically associated with RP105 and positively regulates its expression" p.1348-1353	<u>1-9</u> 10
A	Development <u>121</u> [8] (1995) Harrison S.M. et al., "Isolation of novel tissue-specific genes from cDNA libraries representing the individual tissue constituents of the gastrulating mouse embryo" p.2479-2489	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 5 January, 1999 (05. 01. 99)		Date of mailing of the international search report 19 January, 1999 (19. 01. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04515

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Development <u>121</u> [10] (1995) Guimaraes M.J. et al., "A new approach to the study of haematopoietic development in the yolk sac and embryoid bodies" p.3335-3346	1-10
A	JP, 6-315380, A (Tasuku Honsho, Ono Pharmaceutical Co., Ltd.), 15 November, 1994 (15. 11. 94) & EP, 607054, A & US, 5525486, A	1-10

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N15/63, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18, C12P21/08, A61K38/17 //  
(C12P21/02, C12R1:91)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N15/63, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18, C12P21/08, A61K38/17

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
$\frac{X}{A}$	Nature 377 [6547 suppl] (1995) Adams M.D. et al. 「Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence」 p.3-174	$\frac{1-9}{10}$
P, X	WO, 98/28421, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2.7月.1998 (02.07.98) & AU, 9858027, A	1-10
$\frac{P, X}{P, A}$	J. Immunol. 161 [3] (1998 Aug) Miyake K. et al. 「Mouse MD-1, a molecule that is physically associated with RP105 and positively regulates its expression」 p.1348-1353	$\frac{1-9}{10}$

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.01.99

国際調査報告の発送日

19.01.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之

4 B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3449



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Development 121 [8] (1995) Harrison S.M. et al. 「Isolation of novel tissue-specific genes from cDNA libraries representing the individual tissue constituents of the gastrulating mouse embryo」 p.2479-2489	1 - 10
A	Development 121 [10] (1995) Guimaraes M.J. et al. 「A new approach to the study of haematopoietic development in the yolk sac and embryoid bodies」 p.3335-3346	1 - 10
A	JP, 6-315380, A (本庶 佑、小野薬品工業株式会社) 15. 11月. 1994 (15. 11. 94) & EP, 607054, A & US, 5525486, A	1 - 10